

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

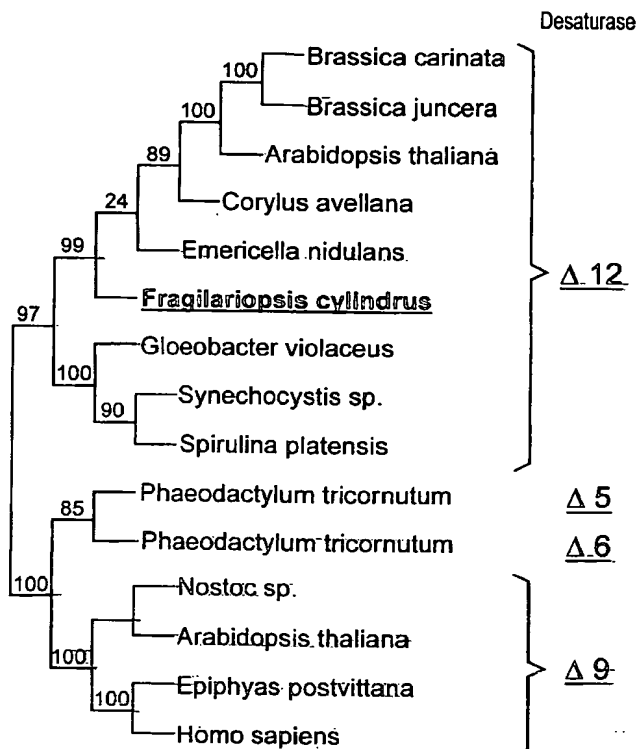
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/009818 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/53, (30) Angaben zur Priorität:  
9/02, A61K 38/44 102 32 621.5 14. Juli 2002 (14.07.2002) DE
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002401 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): STIFTUNG ALFRED-WEGENER-INSTITUT FÜR POLAR- UND MEERESFORSCHUNG [DE/DE]; Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
13. Juli 2003 (13.07.2003) (72) Erfinder; und
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MOCK, Thomas [DE/DE]; Bürgermeister-Smidt-Strasse 178, 27568 Bremerhaven (DE). VALENTIN, Klaus [DE/DE]; Hafenstrasse 62, 27576 Bremerhaven (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE CODING FOR ENZYME DELTA-12-DESATURASE AND ORIGINATING FROM FRAGILARIOPSIS CYLINDRUS, ASSOCIATED POLYPEPTIDE, AND USE OF THIS NUCLEIC ACID SEQUENCE AND POLYPEPTIDE

(54) Bezeichnung: FÜR EIN ENZYM DELTA-12-DESATURASE KODIERENDE NUKLEINSÄURESEQUENZ AUS FRAGILARIOPSIS CYLINDRUS, ZUGEHÖRIGES POLYPEPTID UND VERWENDUNG VON BEIDEN



(57) Abstract: Enzymes from the group consisting of delta-2-desaturases catalyze an important step for the synthesis of multiple unsaturated fatty acids, which are essential to humans and which, for all eukaryotes, serve as important structural elements of the cell membrane and control many vital processes in the organism. This concerns essential nutrients, the need for which having to be covered mainly from plant and animal sources. Known organisms, in which a delta-12-desaturase enzyme naturally occurs, originate exclusively from warm regions, therefore the production of fatty acids requires a supply of heat that is financially expensive and involves the use of extensive equipment. However, organisms also exist that have enzymes that are adapted to the cold. The invention thus relates to a nucleic acid sequence, which codes for enzyme delta-12-desaturase, originates from the marine diatom *Fragilariopsis cylindrus* that is adapted to the cold, and which is formed according to SEQ ID No.1 or as a functional variant or as a segment having at least 8 nucleotides thereof. This results in the provision of a gene that codes for an enzyme, which has properties adapted to the cold and which is important for producing fatty acids, thereby enabling a particularly economical production of fatty acids.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(74) **Gemeinsamer Vertreter:** ALFRED-WEGENER-INSTITUT FÜR POLAR- UND MEERESFORSCHUNG; Herr U. Kersten, Gewerbliche Schutzrechte und Lizenzen, Postfach 120161, 27515 Bremerhaven (DE).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(81) **Bestimmungsstaat (national):** US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) **Zusammenfassung:** Enzyme aus der Gruppe der Delta-2-Desaturasen katalysieren einen wichtigen Schritt zur Synthese der für Menschen essentiellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die allen Eukarioten als wichtige Strukturelemente der Zellmembran dienen und viele lebenswichtige Prozesse im Organismus steuern. Dabei handelt es sich um essentielle Nährstoffe, deren Bedarf hauptsächlich aus pflanzlichen und tierischen Quellen gedeckt werden muss. Bekannte Organismen, in denen ein Delta-12-Desaturase-Enzym natürlicherweise vorkommt, stammen jedoch ausschliesslich aus wärmeren Regionen, so dass bei der Fettsäureproduktion eine ökonomisch und apparatetechnisch aufwändige Wärmezufuhr erforderlich ist. Bekannt sind jedoch auch Organismen, die kälteangepasste Enzyme aufweisen. Die Erfindung beansprucht daher für ein Enzym Delta-12-Desaturase eine kodierende Nukleinsäuresequenz, die aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariopsis cylindrus* stammt und gemäss SEQ ID No.1 oder als funktionelle Variante oder als Abschnitt mit mindestens 8 Nukleotiden davon ausgebildet ist. Damit wird ein Gen zur Verfügung gestellt, das ein bei der Fettsäureproduktion wichtiges Enzym mit kälteangepassten Eigenschaften kodiert, sodass eine besonders wirtschaftliche Fettsäureproduktion ermöglicht wird.

FÜR EIN ENZYM DELTA-12-DESATURASE KODIERENDE NUKLEINSÄURESEQUENZ AUS FRAGILARIOPSIS CYLINDRUS, ZUGEHÖRIGES POLYPEPTID UND VERWENDUNG VON BEIDEN

## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine für das Enzym Delta-12-Desaturase ( $\Delta$ 12-Desaturase) kodierende Nukleinsäuresequenz, auf das zugehörige Polypeptid und auf Verwendungen sowohl der Nukleinsäuresequenz selbst als auch des zugehörigen Polypeptids.

Enzyme aus der Gruppe der  $\Delta$ 12-Desaturasen katalysieren einen wichtigen Schritt zur Synthese der für Menschen essentiellen Linolsäure, die allen Eukarioten als wichtiges Strukturelement der Zellmembran dient und mit den aus ihr entstehenden Eicosanoiden viele lebenswichtige Prozesse im Organismus steuert. Ferner ist Linolsäure, die der Mensch aufgrund des Fehlens des Enzyms  $\Delta$ 12-Desaturase nicht selbst herstellen kann, der Ausgangspunkt für die Synthese weiterer essentieller Fettsäuren, z.B. Arachidonsäure (AA, Eicosatetraensäure ETA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA).

In **Figur 1** ist ein allgemeines Schema der Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFAs) und den beteiligten Enzymen in Eukaryoten dargestellt. Die Umwandlung von Stearinsäure (18 Kohlenstoffe: 0 Doppelbindungen) zu Ölsäure (18:1,  $\Delta$ 9) wird durch eine  $\Delta$ 9-Desaturase katalysiert. Ölsäure wird durch eine  $\Delta$ 12-Desaturase in Linolsäure (18:2,  $\Delta$ 9,12; kurz LA) umgewandelt, die wiederum durch eine  $\Delta$ 6-Desaturase in  $\gamma$ -Linolensäure (18:3,  $\Delta$ 6,9,12; kurz GLA), bzw. durch eine  $\Delta$ 15-Desaturase in  $\alpha$ -Linolensäure (18:3,  $\Delta$ 9,12,15; kurz ALA) umgewandelt wird. Die Verlängerung der Fettsäuren wird durch Elongasen katalysiert, wodurch z. B. aus  $\gamma$ -Linolensäure Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (20:3,  $\Delta$ 8,11,15; kurz DGLA)

gebildet wird, die wiederum durch eine  $\Delta 5$ -Desaturase zu Arachidonsäure (20:4  $\Delta 5,8,11,15$ ; kurz ARA) umgewandelt wird, einem direkten Vorläufer der physiologisch wirksamen Eicosanoide, wie z. B. Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene.

5

Die Familie der PUFAs oder Omega-Fettsäuren ( $\omega$ -Fettsäuren, bei  $\omega$  - Zählweise vom Methyl-Ende her), zu denen die aufgeführten Fettsäuren zählen, beeinflussen generell die Innenflächen der Blut- und Lymphgefäße, die Funktion der weißen Blutkörperchen, die Blutgerinnung und Entzündungs- und Immunreaktionen. Bei einer Mangelernährung mit diesen essentiellen Fettsäuren kann es zu Störungen der entsprechenden physiologischen Prozesse kommen. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Zufuhr von mindestens 12,5 g Linolsäure, die nur bei sehr ausgewogener Ernährung aufgenommen werden. Daher werden Nahrungs-

10 zuzusatz-Präparate angeboten und Grundnahrungsmittel, z.B. Brot, mit essentiellen Fettsäuren angereichert. Durch diese Maßnahmen soll eine Hilfestellung zur besseren Beherrschung des Risikofaktors Herz-Kreislauf-Erkrankungen geleistet werden.

20 Da Vertebraten keine Doppelbindungen hinter Position 9, bei  $\Delta$ -Zählweise vom Carboxy-Ende her, in Fettsäuren einfügen können, sind ungesättigte Fettsäuren wie LA und ALA oder die sie katalysierenden Enzyme  $\Delta 12$ - und  $\Delta 15$ -Desaturasen essentielle Nährstoffe, deren Bedarf hauptsächlich aus pflanzlichen und tierischen Quellen gedeckt werden müssen. Die meisten

25 PUFAs in Menschen und Tieren stammen entweder direkt aus der Ernährung wie Fischen und bestimmten Pflanzen (Olive, Nachtkerze, Borretsch) oder entstehen durch die Umsetzung der durch die Ernährung zugeführten essentiellen Fettsäuren durch Desaturasen und Elongasen. Deshalb sind die Organismen, in denen diese natürlicherweise vorkommen, von großem

30 kommerziellen Interesse. Zum Forschungsprogramm der Pharma- und Nahrungsmittelindustrie gehört daher die ständige Suche nach neuen Quellen,

insbesondere nach entsprechenden Mikroorganismen. Über die direkte Gewinnung von PUFAs aus solchen Organismen hinaus ist durch die heutigen Möglichkeiten der Gentechnologie aber die Kenntnis der in ihnen wirksamen Gene der PUFA-Biosynthese von besonderem Interesse. Durch die gezielte, funktionelle Expression der Gene in Wirtspflanzen wie Sojabohne oder Mais kann eine kommerzielle Produktion von PUFAs in solchen besser zugänglichen Systemen erreicht werden. Aus diesem Grund besteht ein Bedarf an Genen für Desaturasen und Elongasen der PUFA-Biosynthese, sowie für die Gewinnung von PUFAs durch ökonomische Methoden mit Hilfe dieser Gene.

Die Wirkungsweise von Desaturasen im Fettstoffwechsel ist ausreichend bekannt. Es liegt daher eine ganze Reihe von Veröffentlichungen über die Bereitstellung solcher Enzyme, ihrer Aminosäuresequenzen und der für sie kodierenden Gene vor. Beispielsweise ist aus der **WO9411516** „Genes for microsomal delta-12 fatty acid desaturases and related enzymes from plants“ (1994) eine sehr umfangreiche Darlegung der Erkenntnisse zum Fettstoffwechsel bekannt. Hier werden  $\Delta$ -12-Desaturasen aus Pflanzen, z.B. Sojabohne, Ölsaaten Brassica species, Arabidopsis thaliana und Mais, beschrieben. In einem Expressionsverfahren wird der Einsatz von „Gen-Chimären“ zur Transformation von Pflanzen, d.h. die Manipulation des Wirtsgenoms durch Einbau fremder Gene mittels Vektoren, zur vermehrten Produktion essentieller Fettsäuren offenbart. Eine Delta-12-Desaturase, für die eine Nukleinsäuresequenz aus der gemeinen Haselnuss kodiert, ist aus der **EP 0794250** bekannt. Die **WO0020602** „Delta 6 and delta 12 desaturases and modified fatty acid biosynthesis and products produced therefrom“ (2000) beansprucht  $\Delta$ -6- und  $\Delta$ -12-Desaturasen, Nukleinsäuresequenzen, die für solche Proteine kodieren, DNA-Strukturen, die solche Gene enthalten und Mikroorganismen, die erhöhte Mengen solcher Desaturasen exprimieren. Es handelt sich bei den Desaturasen bevorzugt um Isolationen aus dem ölhaltigen Pilz *Mortierella alpina*. In der **DE10044468** „New nucleic acid encoding delta-6-

desaturase, useful for producing ciliates and plants that overproduce unsaturated fatty acids, derived from Tetrahymena" (2001) wird eine  $\gamma$ -Linolensäure aus Linolsäure katalysierende  $\Delta$ -6-Desaturase, gewonnen aus dem Ciliaten Tetrahymena thermophila, beschrieben. Hierbei handelt es sich  
5 um ein wärmeliebendes Wimperntierchen, das sein Aktivitätsmaximum bei höheren Temperaturen hat.

Die kommerzielle Herstellung von essentiellen Fettsäuren aus natürlichen Quellen ist jedoch mit einigen Nachteilen verbunden. Sowohl deren Qualität als  
10 auch die Quantität schwanken und sie weisen teilweise eine heterogene Zusammensetzung auf, wodurch Reinigungsschritte notwendig werden. Dagegen hat sich gezeigt, dass die Ausbeute bei einigen Mikroorganismen im Vergleich zu höheren Pflanzen deutlich besser ist. Aus diesem Grunde bietet die Herstellung von essentiellen Fettsäuren durch Mikroorganismen eine  
15 vielversprechende Alternative zu anderen PUFA-Quellen. Das Fettsäurespektrum vieler Mikroorganismen ist oft recht einfach im Vergleich zu höheren Organismen, was große Vorteile bei der Reinigung bietet. Darüber hinaus ist die fermentative Herstellung nicht von externen Faktoren wie Wetter, Nahrungsangebot etc. abhängig. Außerdem sind auf diese Weise hergestellte  
20 PUFAs weitgehend frei von Kontaminationen die z. B. auf Umweltverschmutzung zurückzuführen sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch fermentative Prozesse gewonnene PUFAs im Gegensatz zu solchen aus natürlichen Quellen keinen Schwankungen in der Verfügbarkeit unterliegen.

25 Desweiteren entstammen alle in den oben zitierten Druckschriften genannten und auch alle weiteren, derzeit bekannten Organismen zur Fettsäureproduktion aus gemäßigten Klimazonen. Somit benötigen alle geeigneten Organismen zur Produktion essentieller Fettsäuren ihren natürlichen klimatischen Umgebungsbedingungen entsprechende Prozessbedingungen, insbesondere deutlich  
30 erhöhte Prozesstemperaturen. Folglich sind stets Einrichtungen zur Temperaturbeaufschlagung, insbesondere aufwändige Zuchtreaktoren zur Produktion erforderlich.

Aus der **Veröffentlichung I** „Zahllose Geheimnisse der Natur“ von K. Eske (vgl. BioLOG, 3.Ausgabe, Februar 2000, Seiten 2/3, abrufbar unter <http://www.Bioregio.org/biolog-3.pdf>, Stand 04.06.2002) ist es bekannt, 5 kälteangepasste Enzyme aus Bakterien, die in Tiefseeregionen vorkommen, zu isolieren. Neben dem Vorteil, dass kälteangepasste Enzyme zur Expression keine erhöhten Temperaturen benötigen, ergibt sich bei den entsprechenden Organismen aus den Tiefseeregionen ein großes Vorkommenspotential, da 80% des die Erdoberfläche bedeckenden Wassers eine Temperatur unter 5 °C 10 aufweist. Mikroorganismen aus kalten Regionen haben einen besonders hohen Anteil an PUFAs, die ein Erstarren der Zellwände bei niedrigen Temperaturen verhindern. Die Temperatur des Aktivitätsmaximums dieser Organismen und ihrer funktionellen Bestandteile liegt deutlich unter dem anderer Organismen aus temperierten und tropischen Breiten. Durch den 15 Einsatz von kälteangepassten Mikroorganismen, auch in gentechnisch modifizierter Form, ist damit eine Produktion unter niedrigen Temperaturen mit einem gegenüber den herkömmlichen Gewinnungsverfahren mit nicht kälteangepassten Organismen deutlich geringerem Energieeinsatz entscheidend wirtschaftlicher als bei deren sonst üblichen Aktivitätstemperaturen.

20

Vor dem Hintergrund dieser bedeutenden Erkenntnisse ist es daher die **Aufgabe** für die vorliegende Erfindung, zur wirtschaftlichen Produktion essentieller Fettsäuren auf Basis eines Enzyms Delta-12-Desaturase einen kälteangepassten Organismus zu finden, der eine Nukleinsäuresequenz 25 aufweist, die für ein kälteangepasstes Enzym Delta-12-Desaturase bei tiefen Prozesstemperaturen kodiert. Die **Lösung** hierfür ist dem Anspruch 1 zu entnehmen. Vorteilhafte Weiterbildungen und Anwendungen, die sich auch auf das zur beanspruchten Nukleinsäuresequenz zugehörige Polypeptid beziehen, sind den unter- und nebengeordneten Ansprüchen zu entnehmen.

30

Mit der erfindungsgemäßen Lösung werden die an die Erfindung gestellten Anforderungen optimal erfüllt. Zum einen weist der beanspruchte Nukleinsäuresequenz aufweisende Organismus ein Delta-12-Desaturase-Enzym auf, das zur Katalyse eines wichtigen Schritts zur Produktion von essentiellen Fettsäuren besonders geeignet ist, zum anderen entstammt der Organismus der antarktischen See, sodass dieses Enzym zusätzlich auch noch kalteangepasst ist und zu seiner Aktivität keine Wärmezufuhr benötigt wird. Die Kenntnis eines solchen Gens ist von elementarer Wichtigkeit, da dieses für ein kalteangepasstes  $\Delta$ 12-Desaturase-Enzym kodiert, das besonders für die Pflanzenzucht in gemäßigten und kälteren Breiten interessant ist. Die mikrobielle Fettsäuresynthese erzielt somit mit der schnell wachsenden Kieselalge mit ihrem kalteangepassten Enzym unter niedrigen Temperaturen hohe Erträge.

Durchgeführte Sequenzanalysen bestätigen, dass die erfindungsgemäß beanspruchte Nukleinsäuresequenz für ein  $\Delta$ 12-Desaturase-Enzym kodiert. Durch die heutigen entwickelten Methoden der automatisierten Sequenzierung von Nukleinsäureabschnitten ist es möglich geworden, in überschaubaren Zeiträumen gezielt Gene mit gewünschten Eigenschaften aus aussichtsreichen Organismen zu isolieren. Umfangreiche öffentliche Datenbanken mit bereits bestimmten, bekannten Funktionen zugeordneten Sequenzen dienen der schnelleren Verifizierung der Ergebnisse der mühsamen Suche. Zur Bereitstellung des für die Sequenzierung aufbereiteten Grundmaterials dient eine Reihe von an sich bekannten Arbeitsschritten:

### **1) Isolation und Kultivierung des Organismus *Fragilariopsis cylindrus***

**Isolation** : Während einer Antarktisfahrt mit dem deutschen Forschungseisbrecher „Polarstern“ in die Weddell-See wurde die Kieselalge aus dem Meereis isoliert. Die Artbestimmung erfolgte in einfacher Weise durch die Typisierung



der Struktur der Schale (vergleiche hierzu die **Veröffentlichung II** von Medlin & Priddle : „Polar marine diatoms“, 2<sup>nd</sup> edition, British Antarctic Survey, Cambridge 1990).

- 5    **Kultivierung** : Die Kieselalge wurde bei 0°C in einem nährsalzangereicherten Medium 2 x f/2 bei 10 µmol Photonen m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> mit 24h Licht, gehältert (vergleiche hierzu die **Veröffentlichung III** von Guillard & Ryther : "Studies of marine plancton diatoms, I. Cyclotella nana (Husted) and Detonula confervacea (Cleve)", 1962, Can.J.Microbiol. 8, 229:239). Für eine gesteigerte Expression
- 10 der für die Kälteanpassung der Art verantwortlichen Gene wurden die Algen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase auf -2°C abgekühlt. Dies entspricht dem Gefrierpunkt von Meerwasser. Nach 5 Tagen wurden die Boten-RNA (mRNA, messenger RNA) aus den Algen isoliert. Die mRNA repräsentieren alle gerade aktiven Gene, also auch diejenigen, die für die
- 15 Kälteanpassung verantwortlich sind.

## 2) Isolation der mRNA

- Die gesamte RNA wurde mit dem RNAeasy Plant Mini Kit (Firma Qiagen)
- 20 isoliert. Aus ca. 100 µg RNA konnte mit Hilfe des Oligotex mRNA Midi Kit (Firma Qiagen) ca. 800 ng RNA für die cDNA-Synthese isoliert werden.

## 3) Herstellung und Screening einer cDNA-Bank

- 25 Die cDNA-Bank wurde auf der Basis der mRNA mit dem SMART cDNA-Library Construction Kit (Firma Clontech) hergestellt:

A) Von der mRNA wurde dazu mit Hilfe von Oligonukleotiden und CDS III/3' Primern der erste cDNA-Strang synthetisiert.

B) Anschließend wurde die Doppelstrangsynthese mit Hilfe der LD-PCR (long distance polymerase chain reaction) im Eppendorf-Thermocycler unter folgendem Programm realisiert:

C)

- 5 1. 5 min Denaturierung bei 95°C, anschließend 20 Zyklen von 6 min bei 68°C und 2 min bei 95°C.
2. Nach einem Sfil-Verdau (mit Restriktionsenzym aus *Streptomyces fimbriatus*) der cDNA wurde sie in CHROMA Spin-400 Säulen der Größe nach fraktioniert, so dass nur cDNAs der Länge >400bp (Basenpaare)
- 10 für die Klonierung zum Einsatz kamen.
3. Diese cDNAs wurden über Nacht bei 16°C in TriplEX2 Vektoren ligiert, die von  $\lambda$ -Phagen aufgenommen werden konnten. Der Titer dieser cDNA-Bank lag bei  $2.7 \times 10^9$  pfu/ml (plaque forming units).
4. Ein Blau-Weiß-Screening mit IPTG (Isopropyl-b-D-Thiogalactosid) und
- 15 X-Gal (X-Galactosid) zeigte eine Rekombinationseffizienz von 70%.
5. Diese cDNA-Bank wurde mit Hilfe einer Digoxigenin markierten  $\Delta$ -12-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* gescreent.
6. Die Hybridisierung erfolge über Nacht bei 50°C
7. Die Stringenzwäsche wurde in 2 x SSC / 0,5 x SDS durchgeführt.

20

#### 4) Sequenzanalyse

Positive Phagen-Plaques wurden vom 5'-Ende mit  $\lambda$ -Primern vom Qiagen-Sequencing-Service sequenziert. Die Sequenzen wurden in der Genbank bei

25 NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit der BLASTX-Option auf ihre Homologien zu vorhandenen Sequenzen untersucht (25.02.2002). Die Vergleichsergebnisse wiesen Scorewerte zwischen 50 und 80 auf. Eine von 20 positiven Phagen-Plaques konnte zweifelsfrei als  $\Delta$ -12-Desaturase identifiziert werden.

30

In Figur 2 ist das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse dargestellt. Danach gruppiert die Desaturase aus *Fragilariopsis cylindrus* mit signifikantem bootstrap support (97% bzw. 99%) mit anderen  $\Delta$ -12-Desaturasen. Es handelt sich daher bei dem kälteangepassten Enzym, das von der beanspruchten

5 Nukleinsäuresequenz nach der Erfindung aus der Diatomee *Fragilariopsis cylindrus* kodiert wird, mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ebenfalls um eine  $\Delta$ -12-Desaturase.

**Sequenzprotokoll**

<110>Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,  
Bremerhaven

<120>Für eine Delta-12-Desaturase kodierende neue Nukleinsäuresequenz  
aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariopsis cylindrus*

<130>AWI 01-0702 DE

<160>1

<210>1

<211>456

<212>DNA

<213>*Fragilariopsis cylindrus*

<400>1

```

20   cc ggg aat tcg gcc att acg gcc ggg gag atc gga tcg act cat gtc      47
      Gly Asn Ser Ala Ile Thr Ala Gly Glu Ile Gly Ser Thr His Val
       1              5              10              15

25   gct cat cat ttg ttt cac gag atg cca cat tac aat gca tta gag gca      95
      Ala His His Leu Phe His Glu Met Pro His Tyr Asn Ala Leu Glu Ala
              20              25              30

30   acg cat gcc atc aga gca ttt ttg gaa cca aaa gga ttg tac aat tat      143
      Thr His Ala Ile Arg Ala Phe Leu Glu Pro Lys Gly Leu Tyr Asn Tyr
              35              40              45

35   gat cct gct cca tgg tac aag gcc atg tgg agg atc gga aaa acg tgc      191
      Asp Pro Ala Pro Trp Tyr Lys Ala Met Trp Arg Ile Gly Lys Thr Cys
              50              55              60

35   cat tac gtt gaa gct gaa act ggt att caa tat tac aaa tca atg gag      239
      His Tyr Val Glu Ala Glu Thr Gly Ile Gln Tyr Tyr Lys Ser Met Glu
              65              70              75

40   gat gtt cca ctt aca aag gat ctg aaa aag gat taaagtaatt cataattcaa      292
      Asp Val Pro Leu Thr Lys Asp Leu Lys Lys Asp
      80              85              90

45   tataccttca attccgctaa atttttcctt gttcaattat atcaactaca cgtacttggt      352
      agatactatt acacagacat gtataaaata gtctatataa catcaacata ataatgaaaa      412
      ttgctattat ttacgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa      456

```

## Patentansprüche

1. Für ein Enzym Delta-12-Desaturase kodierende Nukleinsäuresequenz,  
5 **dadurch gekennzeichnet**, dass  
diese aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariopsis cylindrus* stammt und gemäß SEQ ID No.1 oder als funktionelle Variante oder als Abschnitt mit mindestens 8 Nukleotiden davon ausgebildet ist.
- 10 2. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass  
die Nukleinsäuresequenz als DNA oder RNA, vorzugsweise als doppelsträngige DNA ausgebildet ist.
- 15 3. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass  
die Nukleinsäuresequenz in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor enthalten ist.
- 20 4. Verwendung der Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3 zur Expression oder Überexpression des Enzyms Delta-12-Desaturase in Wirtsorganismen.
5. Zur Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 zugehöriges Polypeptid, das mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.1 oder als  
25 funktionelle Variante oder als Abschnitt mit mindestens 6 Aminosäuren davon ausgebildet ist.
6. Verwendung des zum Protein gefalteten Polypeptids nach Anspruch 5 zur Anreicherung von vom Enzym Delta-12-Desaturase abhängigen Fettsäuren in  
30 Wirtsorganismen.
7. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 6 als Zusatz zu menschlicher Nahrung oder in Medikamenten.

1/2

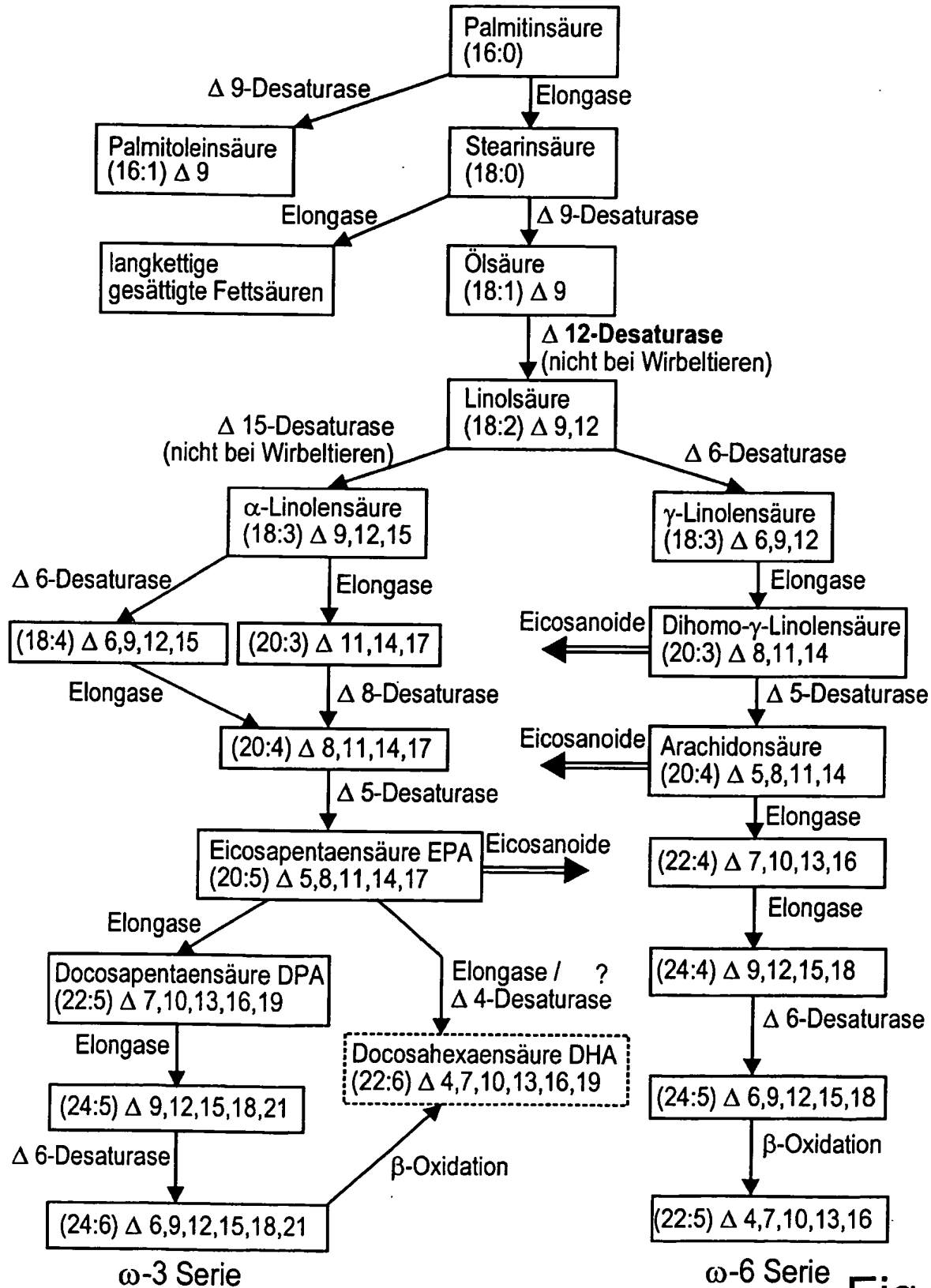


Fig. 1

2/2

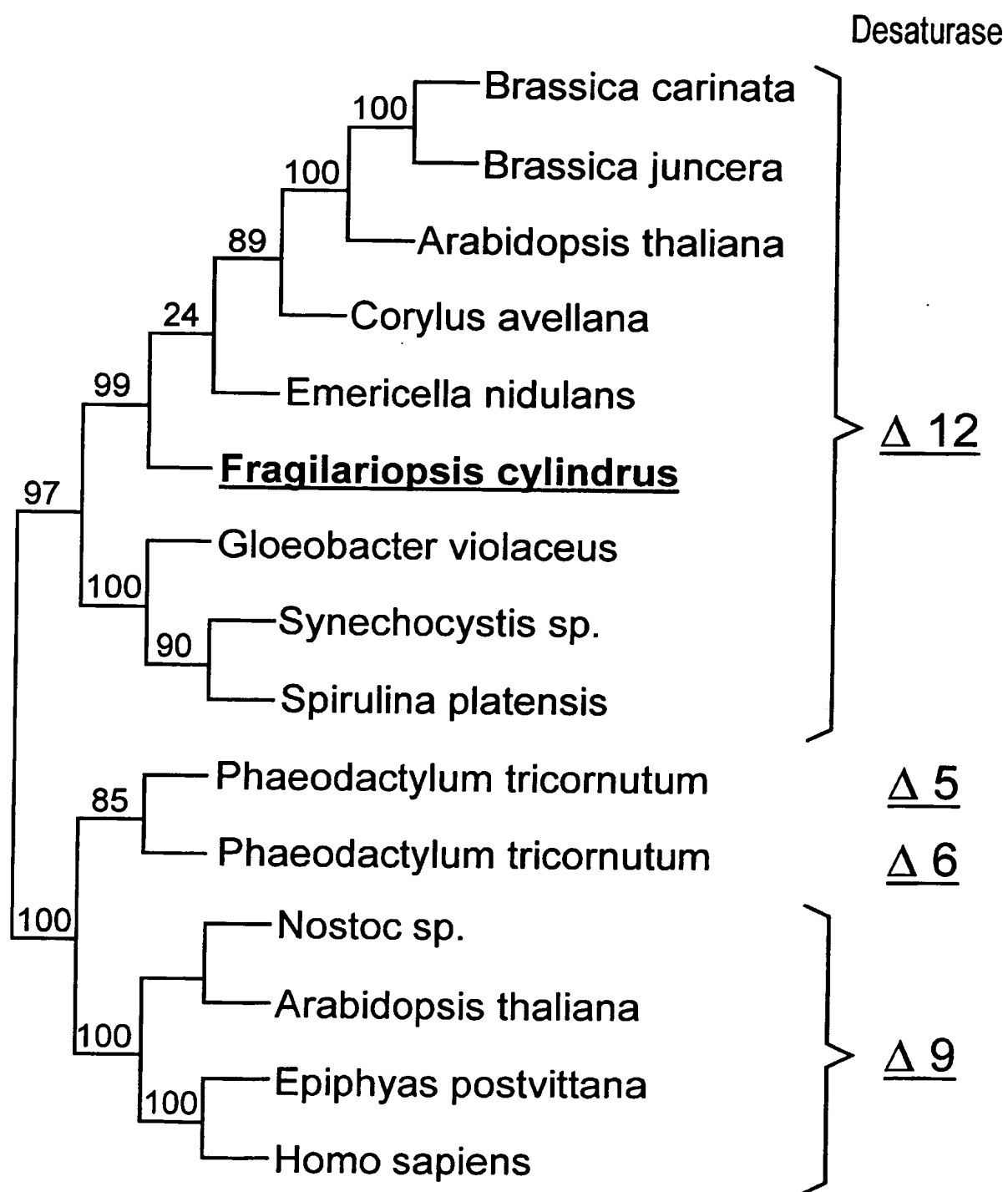


Fig.2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 03/02401

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 A61K38/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TOCHER D R ET AL: "RECENT ADVANCES IN THE BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF FATTY ACYL DESATURASES"</p> <p>PROGRESS IN LIPID RESEARCH, PERGAMON PRESS, PARIS, FR,</p> <p>vol. 37, no. 2-3,</p> <p>7 August 1998 (1998-08-07), pages 73-117,</p> <p>XP001098621</p> <p>ISSN: 0163-7827</p> <p>page 90 -page 91</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2003

Date of mailing of the international search report

22/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, P



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/D/03/02401

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GERSONDE RAINER ET AL: "The reconstruction of late Quaternary Antarctic sea-ice distribution: The use of diatoms as a proxy for sea-ice"</p> <p>PALAEOGEOGRAPHY PALAEOCLIMATOLOGY PALAEOECOLOGY,</p> <p>vol. 162, no. 3-4, October 2000 (2000-10), pages 263-286, XP002263050</p> <p>ISSN: 0031-0182</p> <p>page 263</p> <p>page 265 -page 266</p> <p>---</p>	1-7
A	<p>ESKE, KRISTIN: "Zahllose Geheimnisse der Natur warten noch unter Wasser"</p> <p>BIOLOG,</p> <p>no. 3, 2000, pages 1-7, XP002263051</p> <p>Greifswald, Rostock</p> <p>cited in the application</p> <p>page 2 -page 3</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO)</p> <p>22 October 1998 (1998-10-22)</p> <p>page 1 -page 6</p> <p>page 21</p> <p>page 39 -page 45</p> <p>---</p>	
A	<p>SAKAMOTO TOSHIO ET AL:</p> <p>"Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY,</p> <p>vol. 23, no. 6, 1997, pages 1281-1292, XP002263052</p> <p>ISSN: 0950-382X</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	
P,X	<p>WO 02 057464 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH ;HEINZ ERNST (DE); DUWENIG ELKE (DE); BISC) 25 July 2002 (2002-07-25)</p> <p>SEQ ID NOs: 11 und 12</p> <p>page 1</p> <p>page 29</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 03/02401

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>VALENTIN K.-U. UND MOCK T.: "D12-Desaturase-Enzym aus der kälteresistenten polaren Kieselalge Fragilariopsis cylindrus" AWI HOMEPAGE, 'Online! 27 April 2003 (2003-04-27), XP002263053 Retrieved from the Internet: &lt;URL:http://www.incywincy.com/default?q=fr agilariopsis&amp;catid=42718&amp;cached=http://www .awi-bremerhaven.de/TT/delta12/index-d.htm 1&gt; 'retrieved on 2003-11-27! the whole document</p> <p>-----</p>	1-7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/02401

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846763	A	22-10-1998	US 5968809 A	19-10-1999
			AU 726807 B2	23-11-2000
			AU 6961698 A	11-11-1998
			AU 720677 B2	08-06-2000
			AU 7114798 A	11-11-1998
			BG 103797 A	28-04-2000
			BG 103798 A	31-05-2000
			BR 9808506 A	23-05-2000
			BR 9808507 A	23-05-2000
			CN 1252099 T	03-05-2000
			CN 1253588 T	17-05-2000
			EP 0975766 A1	02-02-2000
			EP 0996732 A1	03-05-2000
			HU 0001236 A2	28-07-2000
			JP 2001523091 T	20-11-2001
			JP 2001527395 T	25-12-2001
			NO 994925 A	30-11-1999
			NO 994926 A	30-11-1999
			NZ 337457 A	28-07-2000
			NZ 337459 A	28-07-2000
			PL 336077 A1	05-06-2000
			PL 336143 A1	05-06-2000
			SK 139899 A3	16-05-2000
			SK 139999 A3	16-05-2000
			TR 9902465 T2	21-01-2000
			TR 9902474 T2	21-02-2000
			WO 9846763 A1	22-10-1998
			WO 9846764 A1	22-10-1998
			US 6410288 B1	25-06-2002
			US 6136574 A	24-10-2000
WO 02057464	A	25-07-2002	DE 10102338 A1	25-07-2002
			CA 2435091 A1	25-07-2002
			WO 02057464 A2	25-07-2002
			EP 1356056 A2	29-10-2003
			NO 20033268 A	17-09-2003

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 A61K38/44

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	TOCHER D R ET AL: "RECENT ADVANCES IN THE BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF FATTY ACYL DESATURASES" PROGRESS IN LIPID RESEARCH, PERGAMON PRESS, PARIS, FR, Bd. 37, Nr. 2-3, 7. August 1998 (1998-08-07), Seiten 73-117, XP001098621 ISSN: 0163-7827 Seite 90 -Seite 91 --- -/--	1-7

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*8\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/12/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, P

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>GERSONDE RAINER ET AL: "The reconstruction of late Quaternary Antarctic sea-ice distribution: The use of diatoms as a proxy for sea-ice"</p> <p>PALAEOGEOGRAPHY PALAEOCLIMATOLOGY PALAEOECOLOGY, Bd. 162, Nr. 3-4, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 263-286, XP002263050 ISSN: 0031-0182 Seite 263 Seite 265 -Seite 266</p> <p>---</p>	1-7
A	<p>ESKE, KRISTIN: "Zahllose Geheimnisse der Natur warten noch unter Wasser"</p> <p>BIOLOG, Nr. 3, 2000, Seiten 1-7, XP002263051 Greifswald, Rostock in der Anmeldung erwähnt Seite 2 -Seite 3</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) Seite 1 -Seite 6 Seite 21 Seite 39 -Seite 45</p> <p>---</p>	
A	<p>SAKAMOTO TOSHIO ET AL: "Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 23, Nr. 6, 1997, Seiten 1281-1292, XP002263052 ISSN: 0950-382X das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
P,X	<p>WO 02 057464 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH ;HEINZ ERNST (DE); DUWENIG ELKE (DE); BISC) 25. Juli 2002 (2002-07-25) SEQ ID NOs: 11 und 12 Seite 1 Seite 29</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-7

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>VALENTIN K.-U. UND MOCK T.: "D12-Desaturase-Enzym aus der kälteresistenten polaren Kieselalge Fragilariopsis cylindrus" AWI HOMEPAGE, 'Online! 27. April 2003 (2003-04-27), XP002263053 Gefunden im Internet: &lt;URL:http://www.incywincy.com/default?q=fr agilariopsis&amp;catid=42718&amp;cached=http://www .awi-bremerhaven.de/TT/delta12/index-d.htm l&gt; 'gefunden am 2003-11-27! das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-7

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/02401

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9846763 A	22-10-1998	US 5968809 A	19-10-1999
		AU 726807 B2	23-11-2000
		AU 6961698 A	11-11-1998
		AU 720677 B2	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0975766 A1	02-02-2000
		EP 0996732 A1	03-05-2000
		HU 0001236 A2	28-07-2000
		JP 2001523091 T	20-11-2001
		JP 2001527395 T	25-12-2001
		NO 994925 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		NZ 337457 A	28-07-2000
		NZ 337459 A	28-07-2000
		PL 336077 A1	05-06-2000
		PL 336143 A1	05-06-2000
		SK 139899 A3	16-05-2000
		SK 139999 A3	16-05-2000
		TR 9902465 T2	21-01-2000
		TR 9902474 T2	21-02-2000
		WO 9846763 A1	22-10-1998
		WO 9846764 A1	22-10-1998
		US 6410288 B1	25-06-2002
		US 6136574 A	24-10-2000
WO 02057464 A	25-07-2002	DE 10102338 A1	25-07-2002
		CA 2435091 A1	25-07-2002
		WO 02057464 A2	25-07-2002
		EP 1356056 A2	29-10-2003
		NO 20033268 A	17-09-2003